UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE de MEDECINE et de PHARMACIE

ANNEE 1963 N° 208

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES Bactéries Sulfato-Réductrices

Les Conditions d'un dosage microbiologique des sulfates

THESE

pour le Doctorat en Pharmacie

(Diplôme d'Université)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1963

devant la

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

JACQUES LIGNIÈRES

MEMBRES DU JURY

MM. BOUISSET, *Président.*
BOURBON
ROUX
BREUILLAUD
PITET
BROUSSY, *Suppléant.*

Assesseurs

IMPRIMERIE PARISIENNE
16, Place du Salin, 16
TOULOUSE

1963

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0078

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

des

Bactéries Sulfato-Réductrices

Les Conditions d'un dosage microbiologique des sulfates

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE de MEDECINE et de PHARMACIE

ANNEE 1963 N° 208

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES Bactéries Sulfato-Réductrices

Les Conditions d'un dosage microbiologique des sulfates

THESE

pour le Doctorat en Pharmacie

(Diplôme d'Université)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1963
devant la
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

JACQUES LIGNIÈRES

MEMBRES DU JURY

MM. BOUISSET, *Président.*
BOURBON
ROUX
BREUILLAUD
PITET
Assesseurs
BROUSSY, *Suppléant.*

IMPRIMERIE PARISIENNE
16, Place du Salin, 16
TOULOUSE
—
1963

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

UNIVERSITE DE TOULOUSE
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN	M.	LAZORTHES
1er ASSESSEUR		BLANC
2e ASSESSEUR		SOREL
Doyens Honoraires	MM.	GORSE
		CALVET
		LEFEBVRE
		BRUSTIER
Professeurs honoraires	MM.	RIBAUT
		VALLOIS
		TAPIE
		DELAS
		RISER

SECTION MÉDECINE - PROFESSEURS

Clinique Médicale	MM.	MERIEL
Clinique Médicale		GADRAT
Clinique chirurgicale et gynecologique		FABRE (P.)
Clinique chirurgicale et du Cancer		GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie		VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques		BAZEX
Clinique des maladies de la Tuberculose et Pathologie interne		MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires		LHEZ
Clinique médicale infantile et Puériculture		SOREL
Clin. médic. de la 1re enfance		BARDIER
Clinique de Neurologie et Psychiatrie		GERAUD
Clinique obstétricale		GUILHEM Paul.
Clinique odonto-stomatologique		CADENAT (H.)
Clinique ophtalmologique		CALMETTES
Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo faciale		CALVET
Clinique rhumatologique		RUFFIE René
Clin. traumatol. des membres		RIEUNAU
Accouchement et obstétricie sociale		PONTONNIER
Anatomie		LAZORTHES
Anatomie appliquée		POULHES
Anatomie pathologique		FABRE (J.)
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale		ANDRIEU
Chimie biologique		VALDIGUIE
Electro-Radiologie		MARQUES
Embryologie générale		BROUSSY Jean
Histologie		BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie		DARNAUD
Médecine Légale du Travail		PLANQUES
Médecine Sociale		BOUNHOURE
Parasitologie		BOUISSET
Pathologie chirurgicale		DAMBRIN
Pathologie générale et Médecine expérimentale		SENDRAIL
Physico-Chimie		AUVERGNAT
Physiologie		LAPORTE (Y.)
Physiologie appliquée et Pharmacologie		BAISSET
Physique biologique et médicale		BUGNARD
Propédeutique médicale		LAPORTE Jacq.
Thérapeutique		DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée	MM.	COULOUMA
Bactériologie	Mme	ENJALBERT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale	MM.	DOUSTE-BLAZY
Histologie et Embryologie		PLANEL
Ophtalmologie		DEODATI
Parasitologie		RUFFIE Jacq.
Physiologie		MONTASTRUC
Physique médicale		BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	MM.	BASTIDE
Anatomie Pathologique		BOUISSOU
Anesthésiologie		LARENG
Carcinologie		ESTRADE
Chirurgie Générale		GÉDÉON
Electro-Radiologie		PONS
Hématologie		DUCOS
Histologie et Embryologie		GUILHEM (André)
Médecine générale		MONNIER
Oto-Rhino-Laryngologie		CLAUX
Pathologie expérimentale		GLEIZES
Physiologie		BESSOU
Physique médicale		COMMANAY

AGREGES

Médecine générale	MM.	RIBAUT
		CALAZEL
		RASCOL
		LE TALEC
		RIBET
Chirurgie générale		ENJALBERT
		FICAT
		PASQUIE
		SOUQUET
		SARRAZIN
		GAUBERT
Dermatol. et syphiligraphie		DUPRE
Hydrologie		DENARD
Médecine légale		GREZES-RUEFF
Neurochirurgie		ESPAGNO Jacq.
Neurologie et psychiatrie		GAYRAL
Obstétrique		ESPAGNO Guy
Ophtalmologie		BEC
Pneumo phtisiologie		DELAUDE

AGRÉGÉS LIBRES

Anatomie	THOMAS
Pathologie Chirurgicale	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE - PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie	Mme	DULUC-MATHOU
Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle	M.	BOURBON
Chimie pharmaceutique		BLANC
Matière Médicale		VINCENT
Pharmacie chimique Pharmacodynamie		CAUJOLLE
Pharmaceutique galénique		STANISLAS
Zoologie	M.	ROUX

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie	M.	COUTURIER

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Microbiologie	M.	BREUILLAUD
Sciences physiques	Mme	CAUJOLLE
Sciences naturelles		PITET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Toxicologie	BROUSSY (G.)

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal	M.	ROCHE
Secrétaire		BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891)

A MA FEMME

A MES PARENTS

A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. BOUISSET

Officier de la Légion d'honneur,
Médaille militaire,
Professeur de Parasitologie à la Faculté.

Vous nous avez accordé le double privilège de nous accueillir dans votre laboratoire et de bien vouloir présider ce jury, très sensible à cet honneur, nous vous prions d'accepter l'expression de notre profonde déférence.

A NÔTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BOURBON

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène Industrielle.

Vous avez bien voulu pendant une année nous initier à nos premiers travaux de laboratoire, vous nous faites l'honneur aujourd'hui de siéger à notre jury de thèse, veuillez accepter avec notre grande reconnaissance nos respectueux remerciements.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. ROUX

Professeur de Zoologie.

En respectueux hommage pour la faveur que vous nous faites de siéger dans notre jury de thèse.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. BREUILLAUD

Professeur sans chaire.

Vous nous avez avec bienveillance et amabilité prodigué tout au long des jours vos conseils et votre aide, nous vous prions de trouver dans ce travail qui porte votre empreinte, l'expression de notre respectueuse considération et de notre profonde gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. PITET

Professeur sans chaire.

En acceptant de siéger à ce jury, vous avez montré l'intérêt que vous portiez à notre travail, permettez-moi de vous en remercier.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. BROUSSY

Maître de Conférence Agrégé.

Nous avons l'honneur de vous voir siéger à notre jury de thèse, nous vous en remercions vivement.

A MONSIEUR G. MICHEL

Chef de Travaux de Microbiologie.

A MONSIEUR V. GRIZOU

Assistant de Microbiologie.

En les priant d'accepter nos vifs remerciements pour l'aide et les conseils qu'ils n'ont cessé de nous donner tout au long de notre travail.

A NOS AMIS DU LABORATOIRE
DE MICROBIOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE

INTRODUCTION

Depuis longtemps il est possible d'utiliser des micro-organismes pour indiquer certaines déficiences minérales des sols. C'est dire que les bactéries permettent. dans certaines conditions, d'apprécier qualitativement et quantitativemment des éléments minéraux.

C'est ainsi qu'un procédé sensible de détection microbiologique de l'Arsenic au moyen de *Penicillium brevicaule* et qu'un indicateur biologique du Fer ont été décrits et utilisés.

Etudiant depuis quelque temps la microflore sulfato-réductrice tellurique, il nous a paru qu'il était possible. à l'aide de souches judicieusement sélectionnées, de mettre au point un dosage microbiologique des sulfates.

Le but assigné à notre travail commande le plan que nous suivrons dans son exposé.

— Dans un premier chapitre, nous étudierons l'importance de la sulfato-réduction dans le cycle biologique du S.

— Dans une deuxième partie, nous décrirons les principales souches microbiennes réductrices de sulfates que nous avons isolé à partir des sols, et nous donnerons

les caractères bactériologiques de la souche-test retenue pour le dosage.

— Le protocole du dosage microbiologique des sulfates sera décrit dans un troisième chapitre.

— Nous envisagerons enfin la possibilité d'un dosage des sulfites après transformation en sulfates.

CHAPITRE PREMIER

PLACE DE LA SULFATO-RÉDUCTION MICROBIENNE DANS LE CYCLE DU S

La réduction des sulfates est un phénomène biologique courant dans les milieux naturels et notamment dans le sol, il est essentiellement sous la dépendance de bactéries, bien que certains auteurs (et en particulier TANNER, 1918) aient pensé que les champignons lévuriformes possédaient cette propriété. Cette hypothèse n'a d'ailleurs pas été confirmée.

Pressentie par MURRAY et IRVINE, la réduction naturelle des sulfates par des microorganismes a été démontrée par BEIJERINCK (1895) qui isola le premier une bactérie anaérobie transformant les sulfates en SH_2. Par la suite, les études physiologiques et biologiques faites sur les souches isolées ont permis d'enrichir le groupe des anaérobies réducteurs de sulfate, en types et variétés. Ils se différencient de l'organisme originel décrit par BEIJERINCK par la nature des composés organiques utilisés ou par leur adaptation réversible à diverses conditions, telles : l'halophilie ou la thermophilie.

Mais, à côté de ces bactéries hautement spécialisées, il peut exister dans les milieux naturels diverses espèces anaérobies ou aérobies, hétérotrophes, présentant dans certaines conditions un pouvoir sulfato-réducteur. Certaines clostridiales allométatrophes, telles que : *Clostridium flabelliferum* et *Clostridium caproicum*, ainsi que parmi les aérobies : *Bacillus megatherium* et certaines souches de *Pseudomonas* et *Proteus*, peuvent présenter temporairement cette propriété.

On est donc en présence d'un groupement physiologique microbien réunissant de très nombreuses espèces et qui présente dans la nature une importance considérable.

En effet, le SH_2 produit par les réducteurs de sulfate est indispensable, comme l'a montré WINOGRASKY, à la nutrition des sulfuraires filamenteux non chlorophyliens qui représentent donc le premier maillon dans la formation initiale des dépôts de soufre. Ces sulfuraires oxydent le gaz SH_2 pour donner le soufre, cette oxydation étant indispensable à leur métabolisme. WINOGRASKY a prouvé que l'excès de soufre n'était pas assimilé par les cellules mais qu'il était dissout et rejeté dans le milieu ambiant et certainement retransformé en acide sulfurique (HOWARD LEES) selon l'équation :

$$SH_2 + \frac{1}{2} O_2 \longrightarrow S + H_2O + 41 \text{ Kcal}$$

$$S + \frac{3}{2} O_2 + H_2O \longrightarrow H_2SO_4 + 118 \text{ Kcal}$$

SH_2 est non seulement utilisé par les sulfuraires non chlorophyliens, mais aussi par les sulfuraires à chlorophylle (genre *Chlorobium* par exemple) pour leur synthèse carbonée. Ils donnent de l'acide sulfurique suivant la réaction de Howard Lees :

$$CO_2 + 2\ SH_2 \xrightarrow[\text{énergie}]{\text{lumière}} (CH_2O) + H_2O + 2\ S$$

$$SH_2 + 2\ H_2O + 2\ CO_2 \xrightarrow[\text{énergie}]{\text{lumière}} 2\ (CH_2O) + H_2SO_4$$

De plus, les thiobacilles transforment le SH_2 en sulfate suivant la réaction :

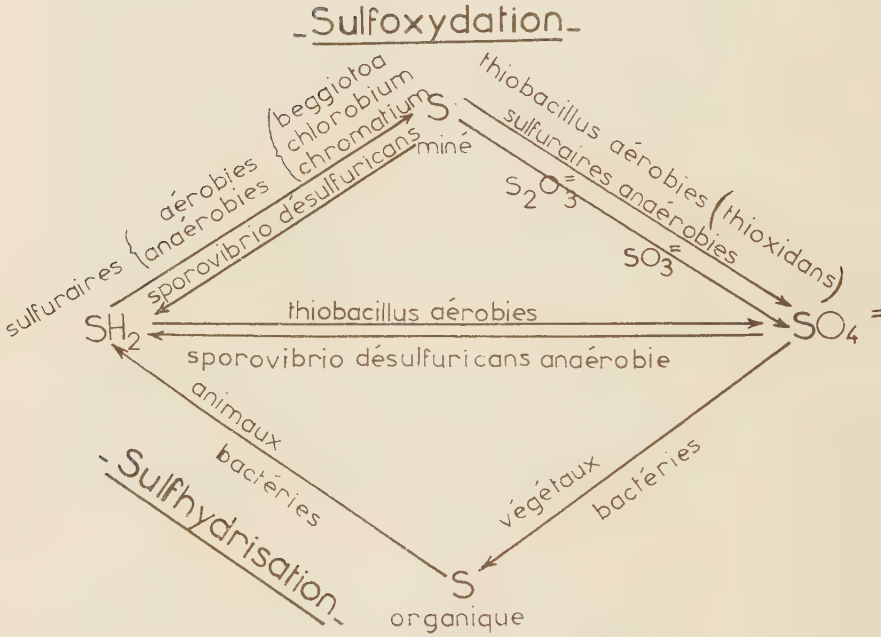
$$SH^- + 40\ Kcal \longrightarrow S + 15\ Kcal \longrightarrow S_2O_3^{--}$$
$$S_2O_3^{--} + 5\ Kcal \rightarrow S_4O_6^{--} + 100\ Kcal \rightarrow SO_4^{--}$$

Les sulfato-réducteurs occupent donc une place primordiale dans le cycle du soufre en permettant la nutrition des sulfuraires et en étant les seuls capables de réduire directement et rapidement les sulfates en SH_2 susceptible de donner du soufre organique.

Leur activité métabolique s'accompagne donc toujours de la production de SH_2 et il peut en résulter des manifestations indésirables, comme la corrosion des structures métalliques. Ils prennent part, en outre, à la formation des pétroles.

Les transformations subies par les composés sulfurés dans les milieux naturels (cycle du soufre) peuvent se décomposer en trois phases (tableau I). On remarquera l'importance dans ce cycle de la sulfato-réduction.

Cycle du S



-TABLEAU: 1-

CHAPITRE II

CHOIX DE LA SOUCHE-TEST CULTURE ET ISOLEMENT DES PRINCIPALES ESPÈCES DE SULFATO-RÉDUCTEURS UTILISÉES

ETUDE DE *SPOROVIBRIO DESULFURICANS*

1. Description et classification

Les nombreuses souches de *Sporovibrio desulfuricans* actuellement connues peuvent être isolées en employant des milieux de culture et des températures d'incubation très divers. Aussi a-t-on pensé qu'il pouvait exister plusieurs espèces différentes. Mais l'étude de ces souches a démontré que leur classification était difficile. Depuis la première description par Beijerinck (1895), il a été généralement admis qu'il n'existe qu'un seul genre diversement désigné par : Bacille, Bactérie, Vibrion, Spirille, Sporo-vibrio et Désulfo-vibrio; Kluyver et Van Niel (1936) les placent dans la tribu des Vibrio avec le nom générique de Désulfo-vibrio.

Until (1930) distinguait trois espèces: non halophile, halophile et thermophile. Mais Baar supposa que celles-ci étaient interconvertibles et il les considéra comme trois variétés d'une espèce unique : *Vibrio desulfuricans*. La sporulation des cultures décrite par Starkey, bien qu'inconstante, constitue un caractère taxinomique supplémentaire qui justifie l'appellation actuelle de *Sporovibrio*.

Dans son traité de systématique bactérienne, A.-R. Prévot (1961) les classe dans la famille des *Sporovibrionaceae* genre unique : *Sporovibrio.*

Il définit le genre de la manière suivante :

Bactéries incurvées en croissant, mobiles par cils polaires unique ou multiples, parfois parapolaires, spore centrale petite, ronde, plus large que le corps microbien, rare (le déterminisme de la sporulation est inconnu).

Thermorésistance faible (5 à 10 mn à 70°C), n'existant qu'en phase sporulée. Chimioautotrophes soit réducteurs de sulfate, soit réducteurs de nitrates, oxydant le Fe; formes libres surtout aquatiques; non pathogènes.

Il décrit l'espèce type : *Sporovibrio desulfuricans.*

Morphologie

Vibrions courts, 3 à 4 μ sur 0,5 à 1 μ; très mobiles par cil polaire, granule noir polaire, gram —, spores petites, difficiles à mettre en évidence. Très polymorphe, il peut se présenter en chaînettes de 10 à 12 vibrions.

Milieu de culture

Anaérobie strict, température optima : 30°C à 55°C; spores résistants 10 mn à 70°C; cultures de grande longévité (exigent un milieu spécial: minéral + sulfates), gazogène. Sur milieu de Van Delden (gélose gélatine + sulfate + lactate de Na) on obtient des colonies noires ouatées. Sur milieu de Beijerinck (gélatine + SO_4Fe + asparagine + lactate de Na) on obtient des colonies punctiformes noires.

Métabolisme

L'espèce peut utiliser un grand nombre de composés organiques comme source d'H_2 (sauf les alcools secondaires et tertiaires et les acides acycliques à chaîne droite). Mais les meilleures sources d'H_2 sont le lactate de Na, le malate de K et les sels acycliques à chaîne ramifiée, les lipides sont attaqués, par contre les glucides sont inutilisables. Les sulfates sont réduits avec dégagement de SH_2 ; ce sont les agents de la fermentation sulfhydrique des sulfates et de la production des gisements de sulfures : ils ne sont pas pathogènes.

D'autres variétés de *Sporovibrios* ont été décrites :

— Variété *Aestuari* :

Bâtonnet semblable à l'espèce normale.

Physiologie :

Semblable à l'espèce normale, exige une haute teneur en ClNa (30 % de ClNa) dans les milieux de culture. C'est la variété halophile qui peut par entraînement lent et progressif de cultures jeunes se désadapter des milieux salés et se réadapter aux milieux non salés. Pour le reste, même nutrition que l'espèce normale.

— Variété *Thermodesulfuricans* :

Comme le précédent, mais sa gamme thermique de développement va de 30°C à 65°C et la réduction des sulfates est maximum à 55°C.

— Variété *Rubentschicki* :

Identique à l'espèce normale, mais peut utiliser les alcools secondaire et tertiaire comme source d'H_2, ainsi que les glucides et les acides acycliques à chaîne droite.

— Variété *Anomalus* :

N'utilise pas les acétates.

— Variété *Ferroxydans* :

Ne pousse pas sur les milieux usuels. Sur gélose + nitrate + sel ferreux, donne des colonies rondes irrégulières, ayant la couleur de la rouille. Il ne réduit pas les sulfates en sulfite.

— Variété *Orientis* :

La spore est très rare, elle est centrale, plus large que le vibrion, quelquefois libre. C'est un anaérobie strict qui a une température optimum de pousse de 30°C-47°C. Sur gélose profonde + sel ferreux — sulfate, il donne des colonies noires par réduction des sulfates en sulfite.

2. Milieu utilisé pour sa culture

Nous avons utilisé uniquement le milieu de Starkey auquel nous avons ajouté en cours d'isolement de la gélose, du sulfate de Na, de l'extrait de levure, du (SO_4Fe, $SO_4(NH_4)_2)_2$; 6 H_2O.

Composition du milieu de Starkey :

PO_4HK_2	0,5 g
$ClNH_4$	1 g
SO_4Na_2, 10 H_2O	0,5 g
Cl_2Ca, anhydre	0,1 g
SO_4Mg, 7 H_2O	2 g
Solution de lactate de sodium à 60 %	6 ml
Eau distillée Q.S.P	1 litre

On dissout les sels dans l'ordre donné par le tableau dans l'eau distillée, on ajuste à pH : 7-7,5, on distribue dans des tubes 5 ml de milieu et on stérilise à 110°C à l'autoclave pendant trente minutes.

3. Technique d'isolement

Les cultures brutes sont facilement obtenues, mais l'isolement de cultures absolument pures est très difficile. Comme l'indiquent Adams et Margaret Thomas, l'introduction des sulfites dans un milieu solide (Starkey gélosé) permet l'obtention de cultures brutes plus pures. En croissance autotrophe, les sulfato-réducteurs utilisent l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le sulfate, thiosulfate, sulfite, comme accepteurs d'hydrogène :

$$SO_4^{=} + 4\ H_2 \rightleftarrows S^{=} + 4\ H_2O + 60\ Kcal$$

Il ne faut pas non plus que la culture soit effectuée dans des milieux absolument privés de fer, mais les traces normalement présentes dans les constituants du milieu sont généralement suffisantes pour un bon développement.

La technique que nous avons employée comporte les étapes suivantes :

a) Culture à partir d'échantillons de divers sols;

b) Enrichissement en milieu liquide;

c) Isolement en milieu solide;

d) Repiquage en milieu liquide.

a) *Culture à partir d'échantillons de divers sols*

Ces échantillons sont ensemencés en milieu de Starkey. Cette première culture sera ensuite réensemencée sur le même milieu.

Technique (selon J. Pochon et H. de Barjac) :

Nous avons réalisé des suspensions-dilutions de terre dans de l'eau de source stérile (cette eau est chauffée à l'autoclave à 120°C pendant une heure de façon à précipiter les alcalino-terreux, puis laissée au repos vingt-quatre heures, filtrée sur filtre Durieux n° 27 et enfin stérilisée à 110°C pendant trente minutes à l'autoclave). Ce sont les dilutions au 1/10, 1/100, 1/1 000, qui nous ont toujours donné les meilleurs résultats.

L'ensemencement est massif : 5 à 6 gouttes de la suspension dans des tubes contenant 5 ml de milieu de Starkey, on ajoute alors 4 gouttes d'une solution de $(SO_4Fe, SO_4 (NH_4)_2)_2 - 6\ H_2O$ à 10 % préparée comme il sera indiqué par la suite. Au bout de 15 à 21 jours on obtient, s'il existait dans l'échantillon des sulfato-réducteurs, un précipité plus ou moins important de sulfure de fer. On choisit pour les repiquages les tubes présentant la réaction la plus intense.

b) *Enrichissement en milieu liquide*

Ici encore nous utilisons le milieu de Starkey.

Technique :

On fait un ensemencement massif du milieu de Starkey régénéré (c'est-à-dire 6 à 7 gouttes, soit un volume de 0,5 ml d'une primo-culture choisie en fonction de sa richesse en sulfato-réducteurs). Nul besoin d'ajouter du fer sous forme de $(SO_4Fe, SO_4 (NH_4)_2)_2 - 6\ H_2O$, car la culture primitive en contient suffisamment pour permettre la croissance. On fait ainsi 4 à 5 subcultures assez espacées entre elles (généralement 15 jours), de façon à enrichir

la culture en sulfato-réducteurs: en effet, le SH_2 dégagé par la réduction des sulfates inhibe la croissance des autres anaérobies qui peuvent souiller le milieu (Grossman et Postgate, 1953).

L'anaérobiose sera réalisée comme dans toutes nos cultures, par l'action du vide après étirage des tubes. Il ne nous a pas semblé utile d'ajouter du sulfite de sodium pour se débarrasser des souillures, car les solutions sont très instables et de plus les cultures ne présentent pas, au gram, un enrichissement nettement plus intéressant que celui obtenu par incubation prolongée en atmosphère saturée en SH_2.

La culture ainsi enrichie sera séparée en milieu solide de façon à obtenir des colonies isolées que nous repiquerons en milieu liquide.

c) *Isolement en milieu solide*

C'est le milieu de Starkey gélosé à 20 ‰ que nous avons utilisé. Il est réparti dans des tubes pour gélose profonde, remplis aux trois quarts et donnant une très bonne anaérobiose (rapport $s/v \leqslant 0.1$). Après stérilisation on ajoute à chacun de ces tubes 1/20 ml de solution à 40 % de $(SO_4Fe, SO_4 (NH_4)_2)_2 \cdot 6\ H_2O$ (de façon à obtenir des colonies sulfato-réductrices colorées en noir et de ce fait faciles à voir et à prélever) et 4/20 ml d'une solution saturée de sulfite de sodium. Comme l'indiquent Adams et Margaret Thomas, l'addition de sulfite de sodium au milieu solide donne un bon isolement des colonies sulfato-réductrices. Nous avons ensemencé quatre tubes contenant du sulfite de sodium à concentration progressivement croissante (1/20 ml de la solution dans le

premier tube, 2/20 ml dans le deuxième, 3/20 ml dans le troisième et 4/20 ml dans le quatrième) et quatre tubes sans sulfite de sodium qui nous servaient de témoins. Au bout de 21 jours, nous avons obtenu des colonies pures de sulfato-réducteurs dans les quatre tubes contenant du sulfite; par contre, dans les tubes sans sulfite, les colonies des sulfato-réducteurs étaient souillées par des bacilles gram +. L'addition de sulfite de sodium est donc parfaitement justifiée, d'autant plus qu'elle n'entraîne aucune variation significative du pH.

L'introduction et la préparation des solutions sulfatées et sulfitées présentent quelques difficultés à cause de leur instabilité (voir préparation en fin de page 27), aussi nous avons toujours utilisé des solutions fraîchement préparées et ajoutées extemporanaiment au milieu, au moment de l'ensemencement.

Après l'addition de ces deux solutions et régénération, on ensemence le milieu lorsque sa température atteint 40°C-45°C. L'ensemencement se fait à l'aide d'une pipette Pasteur fermée et plongée dans la culture en milieu liquide, puis dans le milieu gélosé. Les tubes sont refroidis immédiatement pour solidifier rapidement le milieu. Là encore il est indispensable d'ensemencer massivement (nous avons constaté, en effet, que des dilutions obtenues par addition de 1, 2, 3, 4, 5 gouttes (1 goutte = 1/20 ml) de culture dans 5 ml de milieu de Starkey liquide, ne donnent que très peu de colonies typiques en milieu solide). Les tubes ainsi préparés sont incubés à 28°C.

Après vingt jours environ, on obtient des colonies noires qui sont prélevées et ensemencées en milieu liquide.

d) *Repiquage en milieu liquide*

Le milieu liquide utilisé est toujours le milieu de Starkey, mais additionné de 0,1 % de levure Difco. Nous avons constaté, en effet, que sur un milieu normal, au bout de sept jours, nous n'obtenions aucune pousse appréciable malgré l'addition de $(SO_4Fe, SO_4 (NH_4)_2)_2 \cdot 6 H_2O$. Par contre, sur le milieu de Starkey contenant des traces de sel de Mohr et enrichi de 0,1 % d'extrait de levure Difco, nous avons obtenu une croissance abondante au bout de 48 heures. L'examen microscopique après coloration de gram montre une culture pratiquement pure. Les tubes sont incubés à 28°C. Le repiquage en milieu solide, puis liquide, donne une culture pure de *Sporovibrio*.

4. Métabolisme des sulfates

Une étude effectuée par Dostalek M. et Spurny M. sur l'utilisation des sulfates par le *Sporovibrio desulfu-*

Préparation de la solution de $(SO_4Fe, SO_4 (NH_4)_2)_2; 6 H_2O$:

On fait dissoudre 40 g de $(SO_4Fe, SO_4 (NH_4)_2)_2; 6 H_2O$ dans 100 g d'eau distillée préalablement bouillie de façon à éliminer les gaz dissous, la solution est filtrée sur bougie L3 et prélevée aseptiquement avec une pipette pasteur à boule, elle est mise dans des tubes stériles que l'on étirera et scellera sous vide, ces tubes sont ensuite conservés au réfrigérateur.

Préparation de la solution de SO_3Na_2 :

Solution saturée de SO_3Na_2 dans de l'eau distillée que l'on laisse décanter et que l'on filtre sur bougie L3, on prélève comme précédemment et l'on met dans des tubes stériles que l'on étire et que l'on scelle, on les conserve toujours au réfrigérateur. Nous avons constaté que ces solutions ne sont plus stables au bout d'une semaine.

ricans, a montré que lorsque la concentration en sulfates est plus grande que 0,001 M, le pourcentage d'utilisation diminue progressivement, ce qui est particulièrement évident pour les concentrations supérieures à 0,05 M. Ces auteurs en ont conclu que le milieu nutritif optima doit contenir de 0,005 M à 0,02 M de SO_4Na_2, 10 H_2O. De plus, ils ont prouvé que des concentrations en sulfates très basses ont donné une pousse, mais dans ces conditions la phase de latence est très longue et les sulfates sont plus ou moins réduits quantitativement en SH_2.

La zone d'utilisation des sulfates dans laquelle le *Sporovibrio desulfuricans* donnerait une réponse nette se situerait donc entre 0,005 M à 0,02 M.

Nous avons essayé d'étudier la variation de la pousse avec des doses croissantes de sulfate allant de 0,005 M à 0,02 M, pour cela nous avons réalisé l'expérience suivante :

Tubes.	1	2	3	4
Milieu de Starkey avec Cl_2Mg à la place de SO_4Mg.	5 ml dans tous			
Quantité de SO_4Na_2 10 H_2O (solution à 0,005 M au ml) . . .	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml
Teneur en SO_4Na_2, 10 H_2O.	0,005 M	0,010 M	0,015 M	0,02 M

Mais :

— la durée de la pousse,

— la faible densité optique obtenue au bout de 48 h.,

— le trouble provoqué par l'addition de SO_4Fe,

— la contamination facile du milieu,

— et l'obligation d'avoir une anaérobiose rigoureuse, rendent les lectures photométriques très difficiles.

Aussi, si le *Sporovibrio desulfuricans* est le type des sulfato-réducteurs, les inconvénients précédemment décrits nous l'ont fait abandonner pour réaliser un dosage microbiologique du SO_2 sous forme de sulfate.

CHOIX DE LA SOUCHE-TEST

L'étude de la réduction des sulfates par le *Sporovibrio desulfuricans* en milieu de Starkey nous a montré que la durée de la pousse ainsi que les conditions de culture (en anaérobiose stricte) rendent la méthode difficile et entachée d'erreur et ne permettent pas de faire un dosage rapide et précis de l'ion $SO_4^{=}$.

Nous avons donc cherché une espèce poussant abondamment en aérobiose dans un milieu voisin du milieu de Starkey (le SO_4Mg a été remplacé par le Cl_2Mg) et qui puisse utiliser les sulfates dans des conditions expérimentales précises. Certains *Pseudomonas* et *Proteus* décrits par H. L. A. Tarr et F. W. Tanner répondent à cette définition.

De nombreuses souches ont été ainsi étudiées : deux d'entre elles isolées du sol nous ont paru d'un intérêt particulier. Nous avons donc testé de manière plus précise leur pouvoir sulfato-réducteur.

On a préparé six tubes contenant 5 ml de milieu (SO_4Mg est remplacé par le Cl_2Mg), ce milieu a été tamponné à pH 7.2 et filtré de manière à obtenir un liquide clair permettant une bonne lecture photométrique. Ces six tubes, après addition de sulfate de sodium, de glucose et de levure Difco (voir tableau ci-dessous), ont été ensemencé avec 4/20 ml (4 gouttes) d'une culture de 24 h. de *Pseudomonas*. Une deuxième expérience identique a été réalisée par ensemencement avec 4/20 ml d'une culture de 24 h de *Proteus*.

La lecture des transmissions a été réalisée au photomètre à la longueur d'onde de 420 mμ.

1. *Essai réalisé avec une souche de Pseudomonas*

Tubes	1 sans $SO_4^=$	2 avec 2,5 mg de $SO_4^=$	3 avec 2,5 mg de $SO_4^=$ + glucos	4 sans $SO_4^=$	5 avec 2,5 mg de $SO_4^=$	6 avec 2,5 mg de $SO_4^=$ + glucose	
	avec levure difco à 0,1 %			sans levure difco			
Transmissions	91	95	92	88	94	100	
	22	14	32	53	14	81	Lecture
Différences	69	81	60	35	80	19	au bout de 48 heures.

2. *Essai réalisé avec une souche de Proteus*

Tubes	1 sans $SO_4^=$	2 avec 2,5 mg de $SO_4^=$	3 avec 2,5 mg de $SO_4^=$ + glucos	4 sans $SO_4^=$	5 avec 2,5 mg de $SO_4^=$	6 avec 2,5 mg de $SO_4^=$ + glucose	
	avec levure difco à 0,1 %			sans levure difco			
Transmissions	89	88	95	90	101	102	
	17	16	74	82	95	96	Lecture
Différences	72	72	21	8	6	6	au bout de 48 heures.

Ces essais montrent que la souche de *Pseudomonas* donne une bien meilleure réponse que celle de *Proteus* lorsqu'on utilise le milieu sans levure et sans glucose, ce qui est essentiel pour le dosage microbiologique de l'ion $SO_4^=$. Car on doit, autant que faire se peut, éliminer toute substance nutritive complexe qui pourrait interférer avec l'utilisation de la substance à doser.

Nous avons donc utilisé dans tous nos essais une souche de *Pseudomonas* (dont la détermination suit) et le milieu de Starkey tel que nous l'avons défini précédemment.

Description et détermination de l'espèce utilisée

A.-R. Prévot définit la famille ainsi :

Les *Pseudomonadaceae* sont des cellules allongées en bâtonnets droits ou légèrement incurvés, asporulés, gram —, pigmentés ou non, mobiles en général par cils polaires, ou immobiles et aciliés. Aérobies facultatifs croissant bien à la surface des milieux organiques habituels; hétérotrophes en général avec quelques espèces chimio-hétérotrophes; formes libres, aquatiques ou telluriques; formes parasitaires des plantes et des animaux. Trois tribus :

Tribu des *Pseudomonadae* :

Formes allongées, droites, asporulées, gram —, mobiles par cils polaires ou immobiles. En général pigmentées, formes libres du sol et des eaux, dont beaucoup sont pathogènes pour les plantes.

Caractères bactériologiques

Production d'un pigment jaune verdâtre soluble dans le milieu, insoluble dans le chloroforme.

Mobile par cils polaires.

Pousse sur la gélatine, mais ne la liquifie pas.

Sur gélose, il donne des colonies fluorescentes.

Pousse sur bouillon en donnant une fluorescence.

Pousse sur le lait, mais sans en modifier le pH.

Pas de production d'indol.

Pas d'utilisation du saccharose.

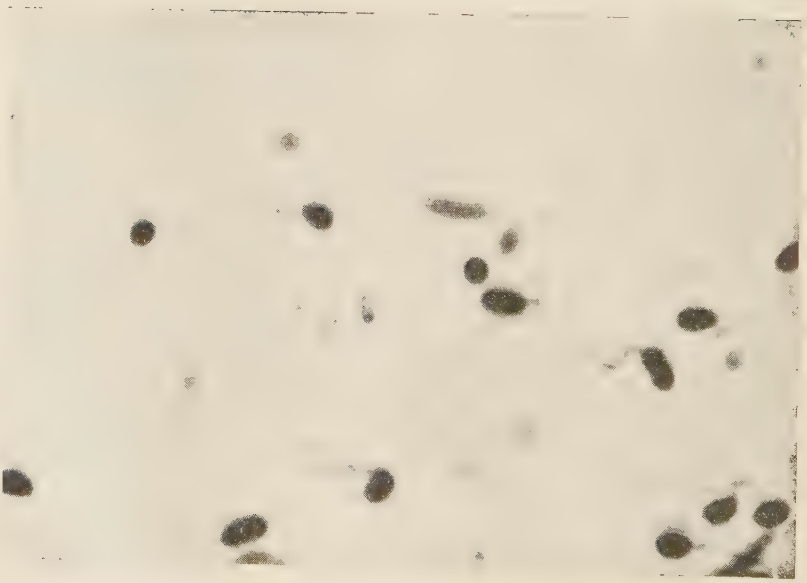
Pousse à 37°C, mais ne pousse pas à 42°C.

Réduction des nitrates en nitrites.

Production de triméthylamine.

Nous concluons donc que le *Pseudomonas* isolé correspond à la description du *Pseudomonas fluorescens* (Variété *putida*).

Sporovibrio desulfuricans



Pseudomonas fluorescens (variété *Putida*)

CHAPITRE III

DOSAGE DES SULFATES SOUS FORME DE SO_4Na_2 PAR LE PSEUDOMONAS FLUORESCENS VARIÉTÉ PUTIDA

Au cours de nos précédentes expériences, la variation de la teneur en sulfate de sodium du milieu nous a semblé en relation directe avec la pigmentation et la croissance du *Pseudomonas fluorescens* (var. *putida*).

Nous avons pensé, en étudiant d'une part la pigmentation et d'autre part le métabolisme des sulfates par le *Pseudomonas putida*, réaliser un dosage bactériologique du sulfate de sodium.

A. Pigmentation

a) *Généralités*

Dans toutes nos expériences il est apparu dans le milieu au cours de la croissance du *Pseudomonas* un pigment vert jaunâtre fluorescent diffusible et insoluble dans le chloroforme. Cette pigmentation nous a paru liée à la présence du soufre; en effet, si lors de la croissance la pigmentation ne s'est pas manifestée dans la totalité des tubes d'une même expérience, elle a toujours apparu dans des tubes renfermant du soufre sous forme de sulfate ou de sulfite et jamais dans ceux qui n'en contenaient pas.

Frank L.H. et Moss R.D. ont étudié la biosynthèse de la pyocyanine sur un milieu minéral contenant du Mg, des phosphates, et des acides aminés, dont le plus actif dans la formation de ce pigment serait l'alanine. Ils ont montré, en outre, que la pigmento-génèse n'avait pas lieu lorsque les sulfates ou l'alanine étaient exclus du milieu.

Il est à remarquer que dans le milieu employé tout au cours de nos expériences, la source carbonnée était constituée par le lactate de sodium et que la pigmentation n'apparaissait qu'en présence de lactate et de sulfate ou sulfite; or, l'acide lactique ne diffère de l'alanine que par remplacement d'un NH_2 par une fonction alcool, on peut donc penser que le *Pseudomonas* utilise le lactate de sodium pour la synthèse de son pigment et que celui-ci à un mode de formation voisin de celui de la pyocyanine.

La présence du soufre est indispensable à la formation du pigment, mais la lumière n'a aucune action sur celle-ci puisque la pigmentation se fait à l'étuve à 37°C à l'obscurité et que l'intensité de la coloration ne cesse de croître. Il semble, par contre, que le pH ait une influence : dans la zone acide, la coloration est inférieure à celle obtenue en zone alcaline pour des densités optiques identiques.

Comme le *Pseudomonas fluorescens* réduit les sulfates en sulfites, nous avons pensé que sous l'influence de ceux-ci il pourrait y avoir réduction d'un précurseur: A.-R. Prévot signale, en effet, dans son traité de systématique bactérienne la réduction d'une substance jaune, la xanthoraphine, en un pigment vert; ceci ne semble pas se produire, car des cultures sur milieu sans sulfate ne se colorent pas après passage d'un courant de SO_2, de plus les sulfites sont surtout réducteurs en pH acide, or le pH du milieu est à 7,2.

On peut émettre encore deux hypothèses :

1° Comme pour les végétaux, le soufre permettrait la formation de protéines du type de la chloroplastine nécessaire par la suite à la synthèse du pigment vert.

2° On peut enfin penser que le soufre entre dans la constitution de la molécule du pigment. mais dans ce cas-là on comprend mal que la formation du pigment ne soit pas proportionnelle à la quantité de soufre mise en jeu (comme nous le montrerons par la suite).

b) *Essai de dosage et résultats*

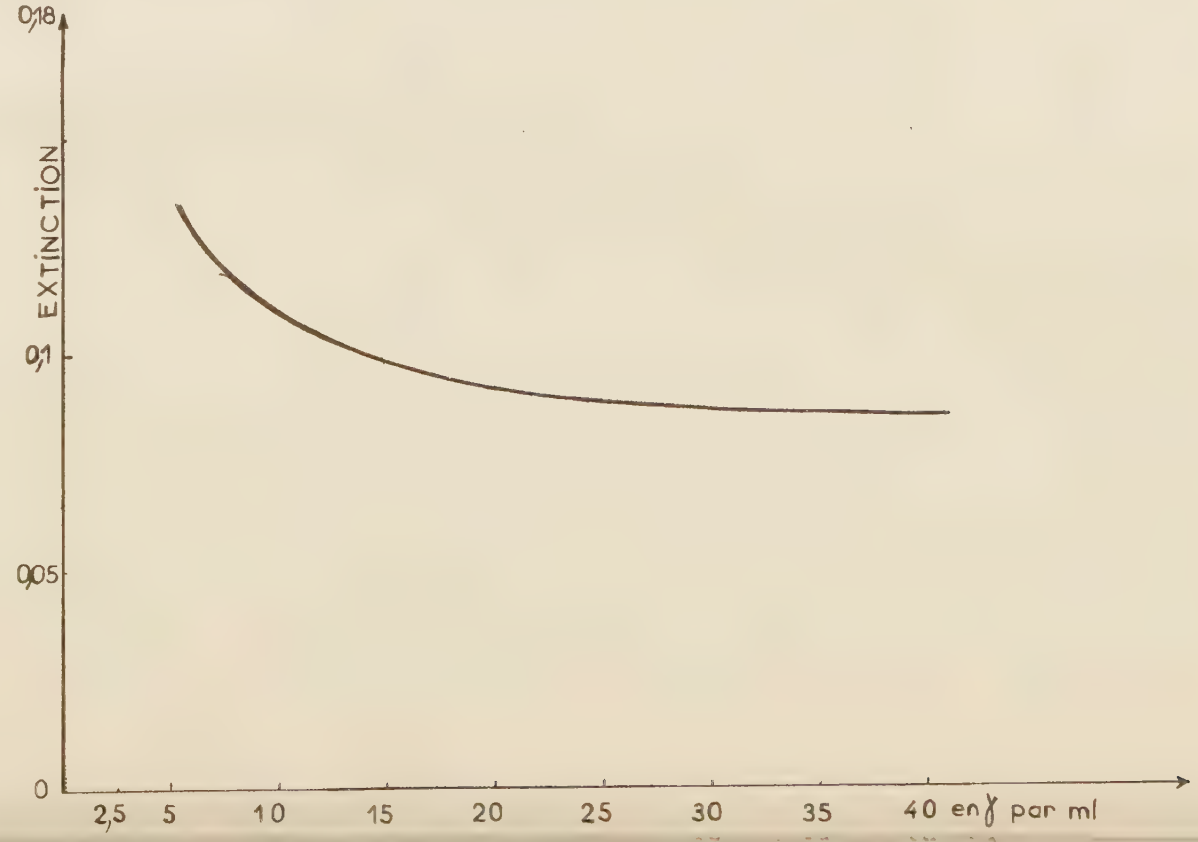
Nous avons voulu faire un dosage des sulfates après extraction du pigment et dosage colorimétrique de celui-ci.

Nous avons utilisé pour cela la galerie de tubes n° 2 dont nous nous sommes servis lors de l'étude des variations des transmissions par rapport aux variations de sulfate de 10 γ à 50 γ par ml, mais ici nous avons ajouté deux tubes contenant 2,5 γ et 5 γ par ml.

L'extraction du pigment a été réalisée de la façon suivante : 5 ml de la culture sont prélevés dans chaque tube, additionnés de 1 ml de chloroforme et agités pendant une minute de façon à précipiter par dénaturation les bactéries. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 25 minutes à 6.500 tours minute. Le liquide surnageant est prélevé et la mesure de l'intensité de la coloration verte se fait au photomètre à la longueur d'onde de : 420 mμ.

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

Tubes.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Transmissions.	80,5	74	78	80		82	74	73	82	80,5	81
Extinctions.		0,131	0,108	0,097		0,086			0,086		
Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml.	2,5 γ	5 γ	10 γ	15 γ	20 γ	25 γ	30 γ	35 γ	40 γ	45 γ	50 γ



La courbe tracée à l'aide de ces résultats comparée à la courbe correspondant au tableau 6 montre que les phénomènes de croissance et de pigmentation sont en partie superposables. Mais pour une même valeur de la croissance dans deux tubes de même teneur en sulfate la pigmentation n'est pas identique. Ce qui nous permet de penser que le soufre entraîne la pigmentation. mais n'en règle pas l'intensité, le phénomène serait donc uniquement qualitatif.

Dans ces conditions, il nous est impossible de faire un dosage des sulfates par extraction du pigment.

B. Métabolisme des sulfates

a) *Généralités*

Nous avons tout d'abord étudié le mode d'utilisation des sulfates par la souche utilisée (réduction et jusqu'à quel stade). Pour cela une recherche de sulfites a été faite par la méthode de Ph. W. West et G. C. Gaeke (dont nous indiquons par la suite le principe). Une coloration rose très nette a été obtenue avec une culture de 24 heures en milieu de Starkey sulfaté et une coloration rose très intense avec une culture de 48 heures.

Un dosage plus précis sur une gamme de flacons contenant des quantités croissantes de sulfate de sodium a montré que la quantité de sulfites formés est proportionnelle à la quantité de sulfate mise en jeu (un témoin contenant le milieu employé non ensemencé a permis de vérifier que celui-ci ne possédait pas de sulfite). Comme nous le montrerons par la suite. la réduction semble ne

pas se poursuivre et s'arrêter au stade sulfite (voir métabolisme des sulfites).

Principe du dosage des sulfites par la méthode de Ph. W. West et G. C. Gaeke :

20 ml de milieu ensemencé sont mis à centrifuger 30 mn à 6.000 tours minute, 10 ml de surnageant sont prélevés et dilués de façon à obtenir avec 1 ml de pararosaniline et 1 ml de formol à 0,2 % (la solution est préparée à partir du soluté officinal de formol), une coloration pouvant être interprétée grâce à une courbe établie au préalable avec des solutions croissantes de sulfite, la lecture se fait au photomètre à la longueur d'onde de : 520 mμ.

Nous avons étudié le métabolisme des sulfates pour des doses croissantes de sulfate de sodium, pour cela nous avons utilisé deux types d'expérimentation : culture en tubes à essai, ou culture en ballons.

La méthode de culture en ballons nous a paru plus précise, car la surface de milieu au contact avec l'air est beaucoup plus importante que dans la méthode de culture en tubes. ce qui permet une meilleure oxygénation. d'où une pousse plus rapide: de plus. la grande quantité de liquide mise en jeu diminue les erreurs faites sur la teneur en sulfate de chaque flacon. Mais si cette méthode donne des résultats beaucoup plus précis que celle en tubes, elle est nettement moins maniable, aussi nous ne l'avons utilisée seulement que pour déterminer la courbe étalon permettant le dosage du sulfate de sodium. Pour l'exploration du métabolisme du sulfate de sodium à des doses variables (ce qui demande de nombreuses manipulations) nous avons utilisé la méthode en tubes.

1. *Technique de la méthode de culture en tubes :*

Les tubes numérotés reçoivent un volume variable de milieu de Starkey sans sulfate (suivant la teneur en sulfate de sodium que l'on désire obtenir dans chaque tube). On ajoute ensuite, dans chacun d'entre eux, une quantité connue d'une solution stérile de sulfate de manière à établir une gamme de concentration en sulfate progressivement croissante. Ces tubes sont bouchés au coton et stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 30 minutes (nous avons constaté, en effet, que ce mode de stérilisation n'entraînait pas de modification des solutions). Ces tubes sont ensuite ensemencés avec une culture de 24 heures de *Pseudomonas fluorescens* dans 10 ml de milieu de Starkey non sulfaté, incubé à 37°C: on ajoute stérilement 1/5 ml de cette culture à chaque tube et l'on prend la transmission initiale au photomètre à une longueur d'onde de 420 mμ; puis, après incubation à 37°C, on note les transmissions à intervalle de temps régulier.

2. *Technique de la méthode de culture en flacons :*

La méthode employée ici diffère de la précédente, car la pousse s'effectue dans des flacons de 500 ml. Les flacons sont numérotés et remplis avec le milieu de Starkey privé de sulfate et avec la solution de sulfate en quantité déterminée par l'expérience, le volume total dans chaque flacon est égal dans tous les cas à 200 ml.

Ces flacons sont obturés avec du coton et mis à l'autoclave à 110°C pendant 30 minutes. Ils sont ensuite ensemencés avec une culture de 24 heures de *Pseudomonas fluorescens* dans 200 ml de milieu de Starkey non sulfaté incubé à 37°C; on ajoute stérilement 8 ml de cette culture

à chaque flacon. On prend la transmission initiale au photomètre à une longueur d'onde de 420 mμ en prélevant dans le flacon ensemencé 5 ml que l'on porte dans un tube calibré, ensuite avec la même méthode on relève les transmissions à intervalle régulier.

Nous décrirons pour chaque expérience le mode de préparation des solutions de sulfate, celle des tubes et flacons, les réponses de croissance et enfin les différences entre les transmissions et les différences entre les extinctions, ce qui nous permettra de tracer les courbes différentielles représentant la variation des transmissions ou des extinctions par rapport à la concentration du milieu en sulfates.

b) *Courbe de croissance*

Nous avons tout d'abord vérifié que la réponse de croissance était dès le début proportionnelle aux variations du milieu en sulfate, ce qui indique une utilisation immédiate de celui-ci.

Quatre solutions de sulfate de sodium anhydre, respectivement à 2 ‰, 3 ‰, 4 ‰, 5 ‰, ont été préparées par dissolution de 2 grammes, 3 grammes, 4 grammes, 5 grammes de sulfate de sodium anhydre dans 1 000 ml de milieu de Starkey non sulfaté; quatre tubes ont été préparés comme l'indique le tableau I.

Nous nous apercevons, après avoir tracé les courbes, que la croissance du tube 3 est plus rapide que celle du tube 1 et celle du tube 4 plus rapide que celle du tube 2. nous obtenons donc une réponse immédiate à une faible variation de concentration en sulfate. Les sulfates sont donc dans ces conditions immédiatement utilisés par le *Pseudomonas fluorescens* (variété *putida*).

TABLEAU I

Préparation des tubes

TUBE 1		TUBE 2		TUBE 3		TUBE 4	
Solution de $SO_4^=$ à 2 g ‰	1/20 ml	Solution de $SO_4^=$ à 3 g ‰	1/20 ml	Solution de $SO_4^=$ à 4 g ‰	1/20 ml	Solution de $SO_4^=$ à 5 g ‰	1/20 ml
Milieu	5 ml	Milieu	5 ml	Milieu	5 ml	Milieu	5 ml
Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml	20 γ	Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml	30 γ	Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml	40 γ	Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml	50 γ

Résultats de la croissance en tube

Tubes	1	2	3	4	
Transmissions	105,5	104	104	103,5	
Transmissions	77,5	83	77	82	Lecture au bout de 14 heures.
Extinctions	0,114	0,081	0,114	0,086	
Transmissions	75	80	74	79	Lecture au bout de 15 heures.
Extinctions	0,125	0,097	0,131	0,102	
Transmissions	71	76	71	72	Lecture au bout de 17 heures.
Extinctions	0,149	0,119	0,149	0,143	
Transmissions	65	67	63	62	Lecture au bout de 20 heures.
Extinctions	0,187	0,174	0,201	0,208	

Etude de la croissance
par rapport aux quantités de sulfates
allant de 0,25 γ à 10 γ par ml

Dans cette expérience, les solutions de sulfate sont préparées à partir d'une solution mère obtenue par dilution de 100 ml d'une solution de sulfate à 0.1 g pour 100 ml. dans 1 000 ml de milieu de Starkey non sulfaté. nous obtenons donc une solution à 1 000 γ pour 10 ml.

Ces solutions sont réparties comme l'indique le tableau II et les courbes différentielles montrent une croissance continue de 2,5 γ au ml à 10 γ par ml, mais un retard important dans la croissance apparaît pour 2.5 γ et aussi pour les valeurs plus petites. Nous avons pensé que ce retard pourrait être expliqué par le fait que le pH a pu varier en cours d'expérimentation.

Pour le vérifier, deux galeries de tubes sont mises en œuvre. les solutions de sulfate sont préparées comme précédemment, mais sont ici ramenées à pH 7,2 par une solution de soude à 20 % ; une vérification du pH des solutions de sulfate après stérilisation et avant ensemencement. montre que celui-ci n'a pas subi de modification. Les solutions de sulfate sont réparties comme l'indiquent les tableaux III et IV. Les tubes sont ensemencés. nous obtenons des courbes différentielles présentant la même baisse de croissance pour la concentration de 2,5 γ que celle donnée par le tableau II. Or. si nous prenons le pH des tubes en fin de croissance, nous nous apercevons qu'il a été modifié notablement pour la concentration de 2,5 γ (pH = 6) ainsi que pour les concentrations allant de 0.5 γ à 5 γ par ml, ce qui explique la baisse de croissance pour ces concentrations.

TABLEAU II

Préparation des tubes

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12
Solution de $SO_4^=$ à 25 γ pour 10 ml	1 ml	2	5	4	5	6	7	8	9	10	Solution de $SO_4^=$ à 500 γ pour 10 ml	1	2
Milieu	9 ml	8	7	6	5	4	3	2	1			9	8
Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml	0,25 γ	0,5 γ	0,75 γ	1 γ	1,25 γ	1,5 γ	1,75 γ	2 γ	2,25 γ	2,5 γ		5 γ	10 γ

Résultats de la croissance en tube

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Transmissions	99	101		102,5	102,5	102	103	103	105	104,5	101	100,5
	79,5	80,5		86,5	88	90	92	96,5	100	100	88	85,5
	74,5	73,5		81	84	82	85	90	95	95	77,5	75

Courbes différentielles

GROUPE I

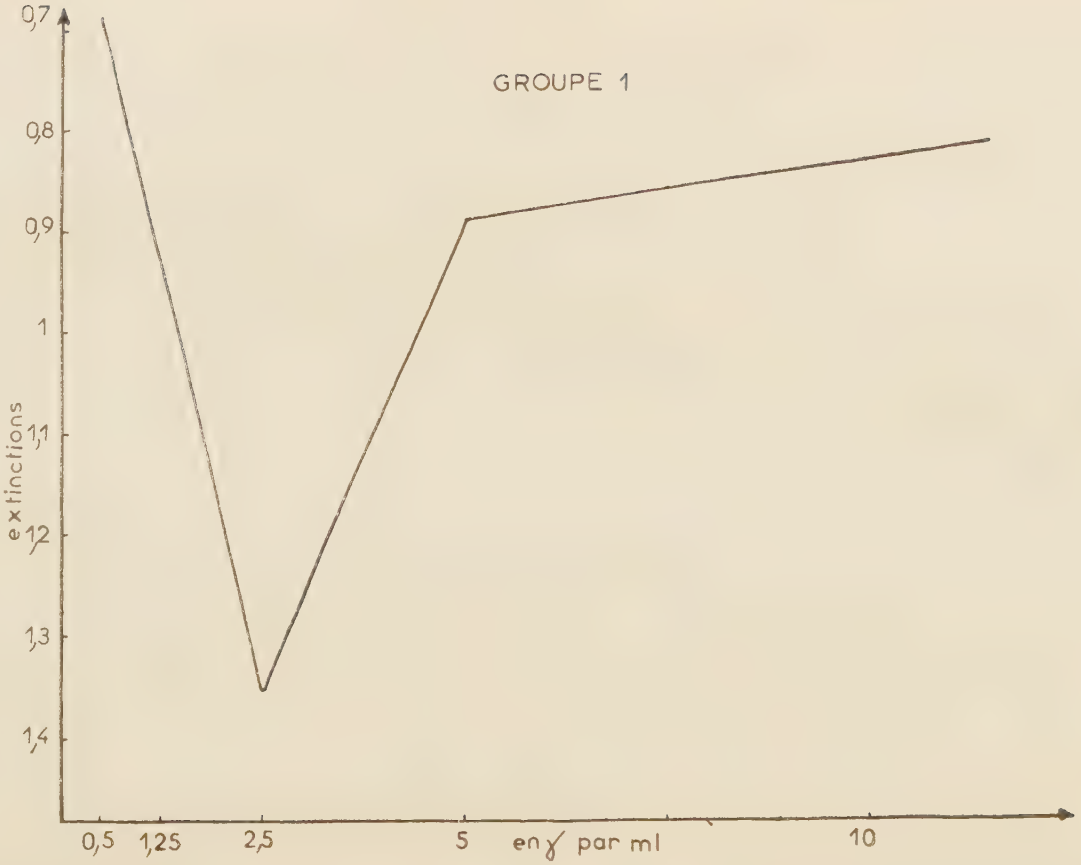
Différences entre les transmissions et les extinctions 1 et 2

Tubes	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Transmissions	19,5	20,5	16	14,5	12	11	6,5	5	4,5	13	15
Extinctions	0,710	0,688	0,796	0,839	0,921	0,959	1,187	1,301	1,347	0,886	0,824

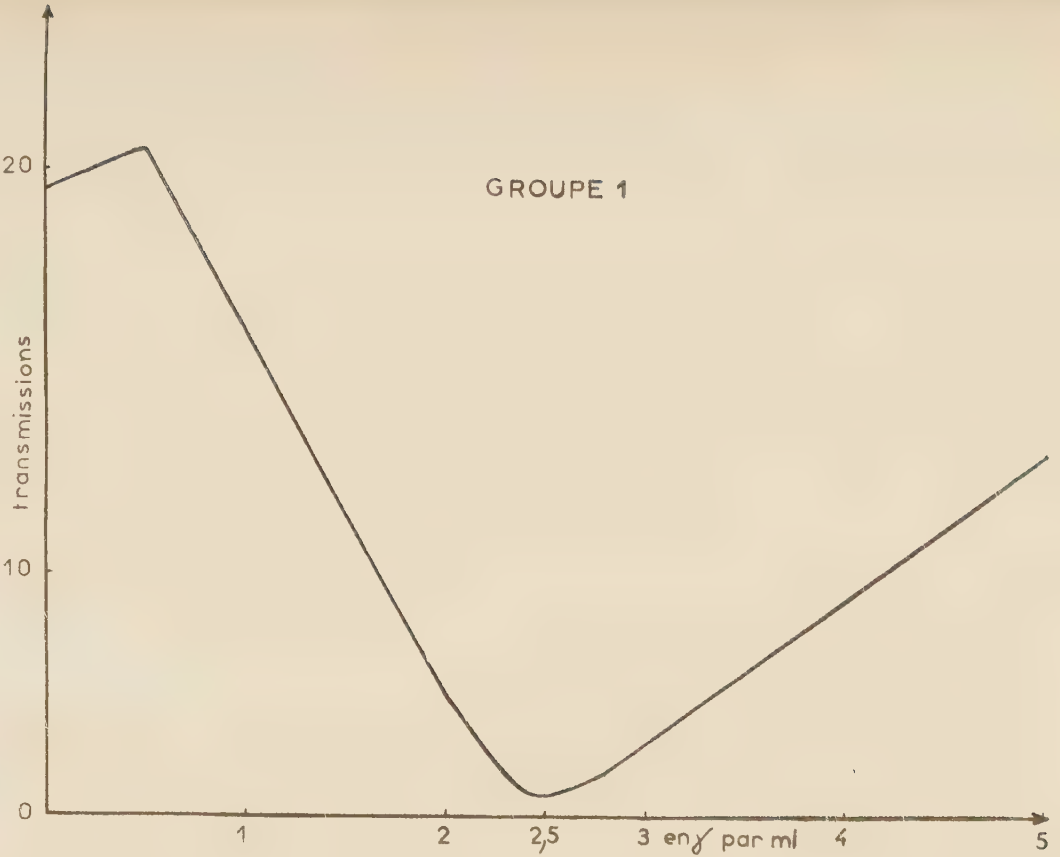
GROUPE II

Différences entre les transmissions et les extinctions 1 et 3

Transmissions	24	27,5	21,5	18,5	20	18	13	10	9,5	23,5	25,5
Extinctions	0,620	0,560	0,668	0,733	0,699	0,745	0,886	1	1,022	0,629	0,594



Courbe correspondant au tableau II



Courbe correspondant au tableau II

TABLEAU III

Préparation des tubes

Tubes.	1	2	3	4	5	6
Solution de $SO_4^=$ à 25 γ pour 10 ml	2 ml	5	10			
Solution de $SO_4^=$ à 50 γ pour 10 ml				9,25		
Solution de $SO_4^=$ à 250 γ pour 10 ml					2	4
Milieu.	8 ml	5		0,75	8	6
Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml.	0,5 γ	1,25 γ	2,5 γ	3,75 γ	5 γ	10 γ

Résultats de la croissance en tube

Tubes.	1	2	3	4	5	6
Transmissions.	101	101	102,5	102,5	101	101
	87	95	101	97,5	94	93
	83	93,5	101	96	91,5	89
	60	72	90	56	67	64

Courbes différentielles

GALERIE I

Différence entre les transmissions et les extinctions 1 et 3

Tubes.	1	2	3	4	5	6
Transmissions.	18	7,5	1,5	5	9,5	12
Extinctions.	0,745	1,125	1,824	1,301	1,022	0,921

TABLEAU IV

Préparation des tubes

Tubes.	1	2	3		4	5	6
Solution de $SO_4^=$ à 25 γ pour 10 ml	2 ml	5	10	Solution de $SO_4^=$ à 500 γ pour 10 ml	0,75	1	2
Milieu.	8 ml	5			9,25	9	8
Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml. . . .	0,5 γ	1,25 γ	2,5 γ		3,75 γ	5 γ	10 γ

Résultats de la croissance en tube

Tubes.	1	2	3	4	5	6
Transmissions.	100,5	101,5	100	101	102	101
	88,5	96,5	99	85	89	88
	86,5	95	99	83	85	85
	58	68	91	43	53	62

Courbes différentielles

GALERIE II

Différence entre les transmissions et les extinctions 1 et 3

Tubes.	1	2	3	4	5	6
Transmissions.	14	6,5	1	18	17	16
Extinctions.	0,854	1,187	2	0,745	0,770	0,796

On constate, d'autre part, que les courbes obtenues jusqu'ici pour des concentrations en sulfate allant de 2,5 γ à 10 γ par ml, ne présentent pas une pente importante et qu'elles ne peuvent convenir dans ces limites à un dosage de sulfate.

Etude de la croissance
par rapport aux quantités de sulfates
allant de 10 γ à 50 γ par ml

Deux galeries de tubes ont été mises en œuvre pour cette étude : les solutions de sulfate sont préparées comme précédemment et réparties comme l'indiquent les tableaux V et VI.

Les courbes obtenues montrent que jusqu'à 50 γ de sulfate par ml, la pente reste toujours faible.

TABLEAU V

Préparation des tubes

Tubes.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solution de $SO_4^=$ à 500 γ pour 10 ml. .	2 ml	3	4	5	6	7	8	9	10
Milieu.	8 ml	7	6	5	4	3	2	1	
Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml.	10 γ	15 γ	20 γ	25 γ	30 γ	35 γ	40 γ	45 γ	50 γ

Résultats de la croissance en tube

Tubes.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Transmissions.	101	102	102	102	102	102	100	102	101
	57	57	54	59		58	56	56	57
	49	48	45	51		45	41	42	41
	47	47	42	48		44	40	41	40

Courbes différentielles

GALERIE I

Différence entre les transmissions et les extinctions 1 et 3

Tubes.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Transmissions.	52	54	57	51		57	60	60	60
Extinctions.	0,284	0,268	0,244	0,292		0,244	0,222	0,222	0,222

TABLEAU VI

Préparation des tubes

Tubes.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solution de $SO_4^=$ à 500 γ pour 10 ml. .	2 ml	3	4	5	6	7	8	9	10
Milieu.	8 ml	7	6	5	4	3	2	1	
Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml.	10 γ	15 γ	20 γ	25 γ	30 γ	35 γ	40 γ	45 γ	50 γ

Résultats de la croissance en tube

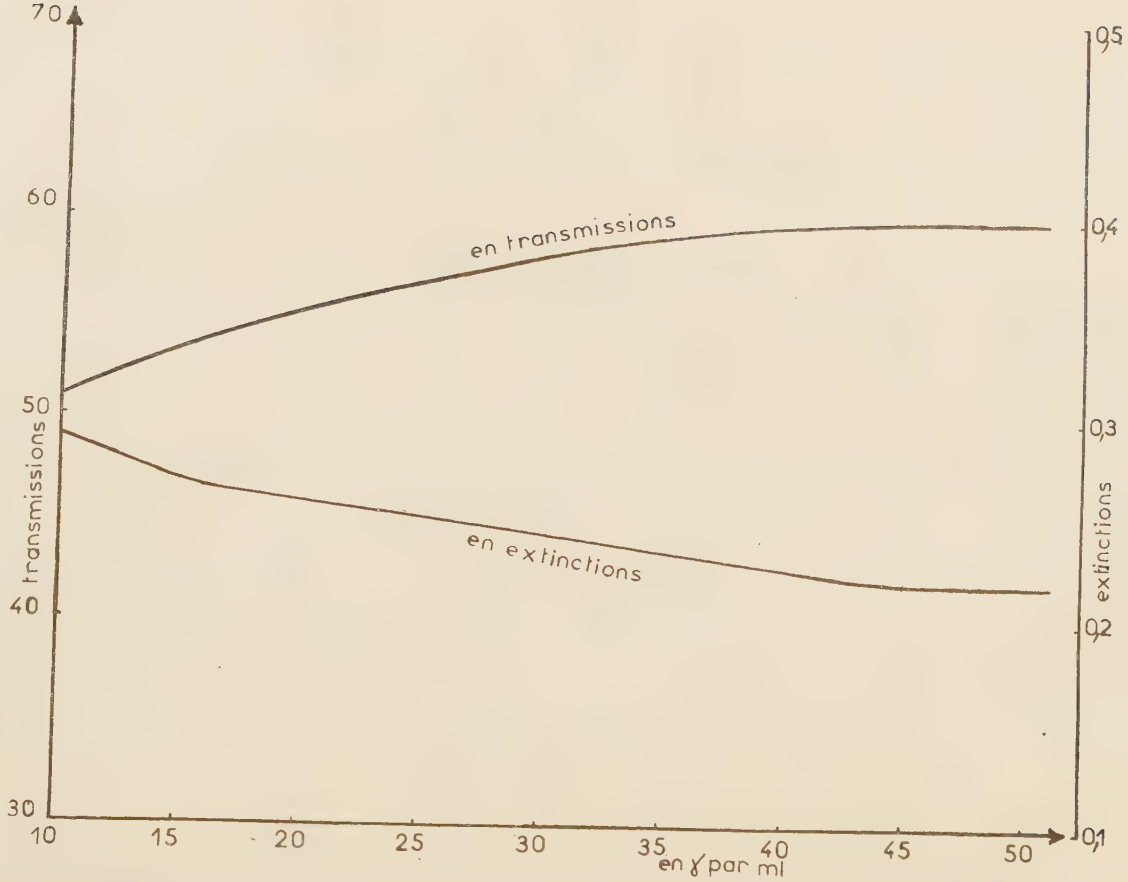
Tubes.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Transmissions.	102	102	101	102	101	102	99	101	100
	62	62	68	58	69	61	62	57	53
	58	57	60	55	60	57	54	51	47
	51	48	46	46	43	44	40	41	40

Courbes différentielles

GALERIE II

Différence entre les transmissions et les extinctions 1 et 4

Tubes.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Transmissions.	51	54	55	56	58	58	59	60	60
Extinctions.	0,292	0,268	0,260	0,252	0,237	0,237	0,229	0,222	0,222



Courbe correspondant au tableau VI

Etude de la croissance
par rapport aux quantités de sulfates
allant de 50 γ à 600 γ par ml

Ayant obtenu avec la méthode en tube une réponse nette entre 100 γ et 400 γ de sulfate par ml, nous avons repris l'expérience avec la méthode de culture en flacons de façon à explorer d'une manière plus précise cette partie de la courbe.

La solution de sulfate utilisée dans cette expérience est à 5 g ‰ et les flacons sont préparés comme l'indique le tableau VII. Les résultats obtenus nous montrent une réponse intéressante aux variations des quantités de sulfate; nous avons, à partir de 450 γ par ml. une phase en plateau, d'où plus de réponse à une augmentation de la quantité de sulfate de sodium.

TABLEAU VII

Préparation des flacons

Flacons.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Solution de $SO_4^=$ à 5 g ‰	2 ml	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Milieu.	198 ml	196	194	192	190	188	186	184	182	180	178	176
Teneur en γ de $SO_4^=$ par ml.	50 γ	100 γ	150 γ	200 γ	250 γ	300 γ	350 γ	400 γ	450 γ	500 γ	550 γ	600 γ

Résultats de la croissance en flacon

Flacons.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Transmissions. . . .	89,5	86	91	93	92	93,5	89	92	95	94,5	93	93
	79,5	74	78	78	76	76	70	71	71	70	71	68

Courbes différentielles

COURBE

Différence entre les transmissions et les extinctions 1 et 2

Flacons.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Transmissions .	10	12	13	15	16	17,5	19	21	24	24,5	22	25
Extinctions. . . .	1	0,921	0,886	0,824	0,796	0,757	0,721	0,678	0,620	0,611	0,658	0,602

transmissions
10
20
30
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600 en γ par ml
en extinctions
en transmissions
extinctions
0,9
0,8
0,7
0,6

c) *Dosage*

Nous pouvons envisager ici de faire un dosage de sulfate; en effet, la partie de la courbe comprise entre 100 γ et 400 γ de sulfate par ml présente une pente suffisante et de plus nous avons montré au début de l'étude du métabolisme du sulfate de sodium par le *Pseudomonas fluorescens* (variété *putida*) que celui-ci était quantitativement transformé en sulfite de sodium.

Pour effectuer ce dosage, la partie centrale de la courbe donnée par le tableau VII, c'est-à-dire la partie comprise entre 100 γ et 400 γ de sulfate par ml. sera utilisée comme courbe étalon.

La quantité de sulfate de sodium à doser est diluée s'il est nécessaire de façon à ce qu'elle se trouve dans les limites de la courbe étalon. On ensemence les flacons contenant le sulfate de sodium à doser en même temps que des flacons témoins renfermant du sulfate de sodium en quantité connue (la préparation et l'ensemencement de ces flacons sont identiques à ceux qui ont permis l'établissement de la courbe étalon). Les lectures des transmissions se font au bout de 14 heures toutes les heures (en effet, la courbe étalon a été établie après une pousse de 14 heures). Lorsque les transmissions données par les flacons témoins atteignent la courbe étalon, on lit celles du ou des flacons essais que l'on rapporte sur la courbe; on a alors directement en abscisse la teneur en sulfate de sodium en γ par ml. pour avoir la quantité contenue dans l'essai il suffit de multiplier le chiffre lu par 200 (car l'on emploie 200 ml de milieu).

CHAPITRE IV

MÉTABOLISME ET DOSAGE DES SULFITES PAR PSEUDOMONAS FLUORESCENS VARIÉTÉ PUTIDA

1. Métabolisme des sulfites

Bien que nous ayons montré que le sulfite semblait être le terme de la réduction des sulfates par la souche-test, nous avons voulu faire l'étude des courbes de croissance en fonction de la variation de la quantité de sulfite.

Nous avons utilisé ici la méthode de culture en flacon. Douze flacons ont été préparés comme l'indique le tableau VIII (mais ici, à cause de l'instabilité des solutions de sulfite, la stérilisation de celles-ci s'effectuera sur bougie L3 et elles seront ajoutées au milieu au moment de l'ensemencement). Les résultats nous indiquent que la pousse est uniforme dans tous les tubes, de plus, la croissance est beaucoup plus rapide que ne l'était celle avec les sulfates. Cette uniformité de la pousse peut nous faire penser que l'on se trouve dans la phase en plateau. Aussi une deuxième expérience a été réalisée avec cinq flacons seulement; la pousse a été suivie de deux heures en deux heures et nous nous sommes aperçus que celle-ci restait identique à quelques unités près dans tous les flacons (voir tableau IX). Nous avons fait un dosage par la pararosaniline, avant l'ensemencement et en fin de pousse, de la quantité de sulfite contenue dans chaque flacon, ce qui nous a prouvé que les sulfites n'étaient pas utilisés. Nous pouvons penser que la souche-test, dans les conditions de l'expérience, ne dépasse pas, dans la réduction des sulfates, le stade sulfite.

TABLEAU VIII

Préparation des flacons

Flacons.	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
Solution de $SO_4^=$ à 5 g ‰.	0,5		1		2		4		6		8		10		12		14		16		18		20	
Milieu.	199,5		199		198		196		194		192		190		188		186		184		182		180	
Teneur en $SO_4^=$ en γ par ml.	12,5 γ		25 γ		50 γ		100 γ		150 γ		200 γ		250 γ		300 γ		350 γ		400 γ		450 γ		500 γ	

Résultats de la croissance en flacon

Flacons.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Transmissions.	96	97	97,5	94	94,5		97	97	96	96	97,5	97
	58	57	58	57	54		61	59	58	64	67	60
Différences.	38	40	39,5	37	40,5		36	38	38	32	30,5	30

TABLEAU IX

Préparation des flacons

Flacons.	1	2	3	4	5
Solution de $SO_4^=$ à 5 g ‰. .	0,5 ml	4	12	20	26
Milieu.	199,5 ml	196	188	180	174
Teneur en $SO_4^=$ en γ par ml.	12,5 γ	100 γ	300 γ	500 γ	650 γ

Résultats de la croissance en flacon

Flacons.	1	2	3	4	5	
Transmissions.	94	99	99	96	98	
	91	93	95	95	95	Lecture au bout de 4 h de pousse.
	80	82	84	83	82	Lecture au bout de 6 h.
	77	79	81	80	79	Lecture au bout de 8 h.
	74	76	78	77	76	Lecture au bout de 10 h.
	51	53	55	54	53	Lecture au bout de 15 h.
	43	46	44	42	45	Différences entre la dernière transmission et la première.

2. Dosage des sulfites

Le métabolisme des sulfites par l'intermédiaire de *Pseudomonas fluorescens* nous a montré qu'il était impossible de faire un dosage de SO_2 sous forme de SO_3Na_2 par les courbes de croissance; aussi nous nous sommes proposés de faire un dosage de SO_2 en le transformant en SO_4Na_2, nous utiliserons ensuite pour doser le SO_4Na_2 formé la partie utile (comprise entre 50 γ et 400 γ de SO_4Na_2 par ml), de la courbe donnée par la croissance de la souche-test.

a) *Transformation du SO_2 en SO_4Na_2*

Méthode :

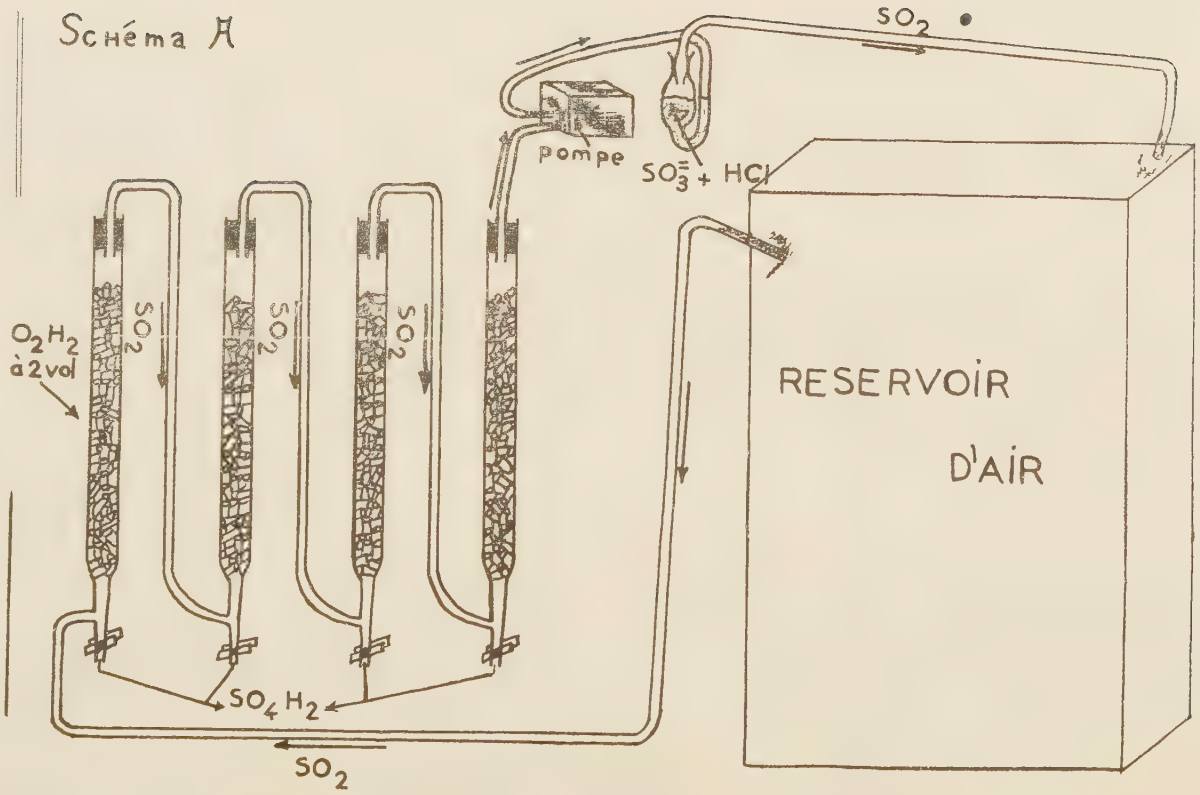
Nous avons employé la méthode préconisée par le Laboratoire municipal de la ville de Paris (Professeur H. Moureu).

Cette méthode met en œuvre de l'eau oxygénée à deux volumes, ce qui permet la transformation du SO_2 en SO_4H_2 suivant la formule :

$$SO_2 + O_2H_2 \longrightarrow SO_4H_2$$

L'appareil indiqué sur le schéma A a été utilisé, 100 ml d'eau oxygénée à deux volumes sont répartis dans les quatre colonnes, à l'aide d'une pompe on fait passer lentement l'air chargé en SO_2 dans les colonnes. au bout de 24 heures on recueille l'eau oxygénée contenant le SO_4H_2 obtenu, que l'on neutralise par la soude, ce qui donne SO_4Na_2. On chauffe ensuite à douce ébullition

Schéma A



TRANSFORMATION de SO_2 en SO_4H_2

pendant 30 minutes pour chasser l'excès d'eau oxygénée qui empêcherait la pousse microbienne.

100 ml de cette eau oxygénée peuvent transformer jusqu'à 1,12 g de SO_2.

Essai de la méthode avec une quantité connue de SO_2 :

Nous avons tout d'abord essayé de savoir si la transformation en SO_4H_2 était quantitative et si après ensemencement en même temps que des témoins les transmissions obtenues se retrouvaient sur la courbe.

Essai :

Nous avons utilisé 2 ml d'une solution de sulfite neutre de sodium, titrant en SO_2 5.000 γ par ml, acidifiée par 1 ml de HCl, placés dans une ampoule soumise à un courant d'air (voir schéma A), ce qui a pour but d'entraîner le SO_2 ainsi formé,

$$SO_3Na_2 + 2\ HCl \longrightarrow SO_2 + 2\ ClNa + H_2O$$

et de faire barboter ce gaz dans l'eau oxygénée à 2 volumes comme précédemment.

Au bout de 24 heures, on prélève l'O_2H_2, que l'on neutralise par de la soude jusqu'à pH 7.2. Théoriquement il s'est formé :

$$\frac{10.000 \times 142}{64} = 22.187\ \gamma \text{ de } SO_4Na_2 \text{ pour } 100 \text{ ml}$$

de O_2H_2, d'où 22.187 mg. Après dosage par le chlorure de baryum, nous avons vérifié qu'il s'était effectivement formé cette quantité de SO_4Na_2 (O_2H_2 ne doit pas contenir des ions $SO_4^{=}$, elle doit donc être obtenue par la méthode à l'anthraquinone).

Nous avons ensuite préparé quatre flacons comme l'indique le tableau ci-dessous :

Flacons.	1	2
Milieu de Starkey à double concentration.	100	100
O_2H_2 neutralisée et chauffée, à : 22,2 mg de SO_4Na_2 pour 100 ml. .	100	100
Teneur en SO_4Na_2 en γ par ml.	111 γ	111 γ
Flacons.	3	4
Milieu de Starkey à double concentration.	100	100
O_2H_2 à 33,4 mg de SO_4Na_2 pour 100 ml	100	100
Teneur en SO_4Na_2 en γ par ml.	167 γ	167 γ

Le milieu de Starkey doit se trouver à double concentration de façon à avoir une concentration finale en constituants égale à celle du milieu utilisé jusqu'ici.

Les solutions de SO_4Na_2 sont préparées par la méthode précédente en employant deux et trois ml de SO_3Na_2 en solution à 5.000 γ de SO_2 par ml.

Il faut faire bouillir l'eau oxygénée avant d'ajouter le milieu de Starkey de façon à ce qu'elle ne puisse pas agir sur les constituants du milieu (en particulier sur la solution de lactate de Na).

On prépare, en outre, quatre témoins de la façon suivante :

Flacons.	5	6	7	8
Solution de SO_4Na_2 à 5 g ‰.	8 ml	8 ml	12 ml	12 ml
Milieu de Starkey. .	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml
Teneur en γ par ml.	200 γ	200 γ	300 γ	300 γ

Ces flacons, après ajustement du pH à 7,2 et douce ébullition pendant 30 minutes, sont stérilisés à l'autoclave à 110°C. Nous avons contrôlé dans le flacon n° 1 (par un nouveau dosage au chlorure de baryum) que la teneur en sulfate de sodium n'avait pas varié au cours de la stérilisation.

Nous avons ensemencé ces flacons par 8 ml d'une culture de 24 heures en milieu de Starkey non sulfaté. Nous avons relevé les transmissions initiales et, au bout de 14 heures d'incubation, nous les avons prises d'heure en heure; nous avons ainsi vérifié que lorsque celles données par les flacons 5, 6, 7, 8 se trouvaient sur la courbe étalon, celles données par les flacons 2, 3, 4 s'y trouvaient également.

b) *Courbe étalon*

La courbe étalon utilisée dans le dosage des sulfates sous forme de sulfate de sodium ne peut être employée ici, car le milieu de Starkey initial a été modifié par l'apport d'eau oxygénée.

Une courbe de référence pour le dosage du SO_2 a été établie de la façon suivante :

La méthode de culture en flacon a été utilisée, 8 flacons ont été préparés comme l'indique le tableau X. Ici, pour se trouver dans les conditions du dosage, les constituants du milieu de Starkey sont dissous dans une partie d'eau distillée pour une partie d'eau oxygénée à 2 volumes préalablement chauffée à douce ébullition pendant 30 minutes; les flacons ont été ensemencés avec 8 ml d'une culture de 24 heures. Les résultats obtenus montrent une pente importante pour la courbe n° 1 et moins importante pour la courbe n° 2, nous avons donc choisi comme courbe étalon la courbe n° 1. Le dosage s'effectuera 14 heures après l'ensemencement (le tableau X nous montre en effet que c'est alors que les résultats les plus précis sont obtenus). Pour avoir un bon dosage comme nous l'avons montré, nous utiliserons la partie de la courbe comprise entre 100 γ et 350 γ par ml.

c) *Protocole expérimental définitif*

1. *Limite du dosage :*

Le dosage du SO_2 ne peut s'effectuer que pour des doses supérieures à :

$$\frac{100 \times 64}{142} = 45 \text{ } \gamma \text{ de } SO_2 \text{ par ml,}$$

ce qui équivaut avec notre technique à 9.000 γ de SO_2 pour 2 m^3 (car, en 24 heures, on fait passer à l'aide de la pompe 2 m^3 d'air dans l'eau oxygénée), c'est-à-dire 4,5 mg pour 1 m^3 ≠ 1.6 PPM (1 PPM = 2,8 mg de SO_2 par m^3).

TABLEAU X

Préparation des flacons

Flacons	1	2	3	4	5	6	7	8
Solution de $SO_4^=$ à 5 g ‰	2 ml	4 ml	6 ml	8 ml	10 ml	12 ml	14 ml	16 ml
Milieu	198 ml	196 ml	194 ml	192 ml	190 ml	188 ml	186 ml	184 ml
Teneur en $SO_4^=$ en γ par ml	50 γ	100 γ	150 γ	200 γ	250 γ	300 γ	350 γ	400 γ

Résultats de la croissance en flacon

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	
Transmissions	98	101	98	83	95	100	102	81	
	74	75	48	50	50	54	47	57	Lecture au bout de 14 h.
	63	71	47	47	45	49	43	55	Lecture au bout de 17 h
	65	69	42	43	41	48	37		de pousse.
	61	61	41	41	42	47	38	51	Lecture au bout de 20 h.
	64	65	42	41	42	43	36	51	Lecture au bout de 22 h.

Courbes différentielles

COURBE 1

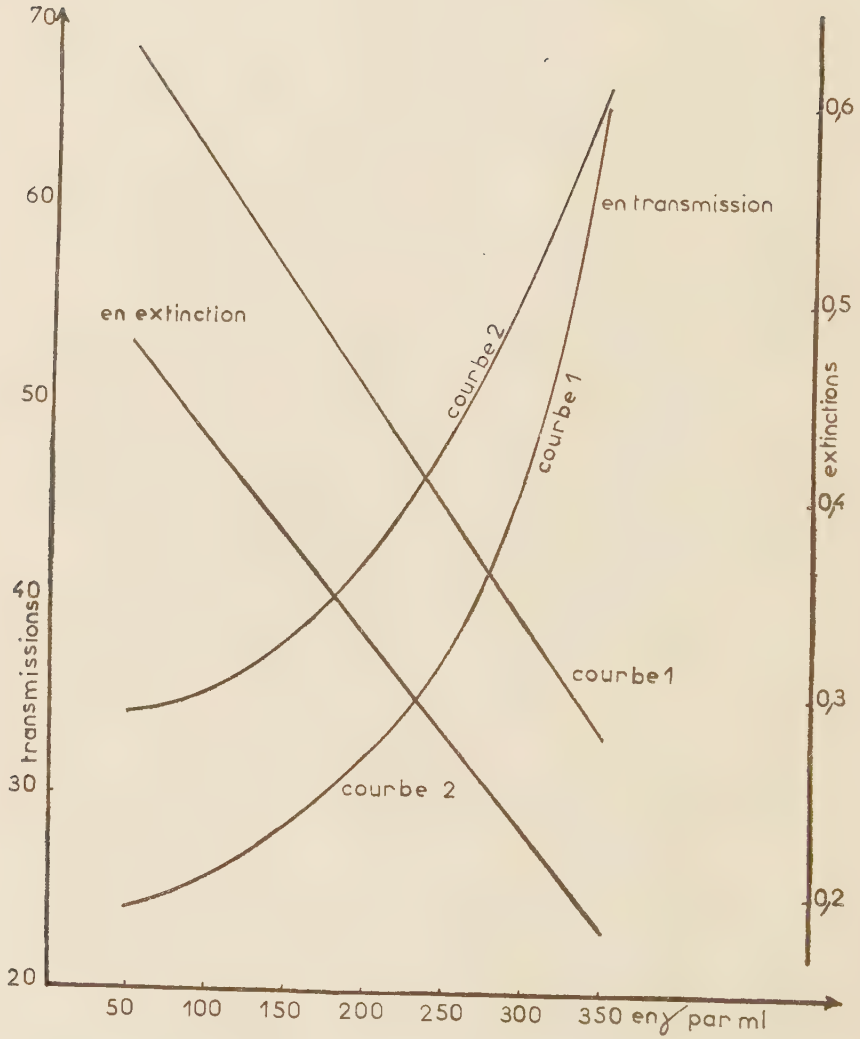
Différence entre les transmissions et les extinctions 1 et 2

Flacons	1	2	3	4	5	6	7	8
Transmissions	24	26	50	33	45	46	65	26
Extinctions	0,620	0,585	0,301	0,482	0,347	0,337	0,187	0,585

COURBE 2

Différence entre les transmissions et les extinctions 1 et 6

Transmissions	34	36	36	42	53	57	66
Extinctions	0,469	0,444	0,444	0,377	0,276	0,244	0,181


70
60
50
40
30
20
transmissions
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
extinctions
en transmission
en extinction
courbe 2
courbe 1
courbe 1
courbe 2
50
100
150
200
250
300
350 en γ par ml

Pour les doses supérieures à :

$$\frac{350 \times 64}{142} = 157\ \gamma \text{ de } SO_2 \text{ par ml,}$$

ce qui équivaut à 15.750 γ pour 1 m^3 # 5,6 PPM. on fait plusieurs dilutions de la solution de sulfate de sodium formée.

Il est à remarquer que 100 ml d'eau oxygénée peuvent transformer théoriquement 1.12 g de SO_2 en acide sulfurique, soit 400 PPM. Pratiquement une telle concentration en SO_2 ne se rencontre jamais dans l'air, il n'y a donc pas de limite supérieure au dosage.

2. *Sensibilité :*

Elle se situe entre 1, 2, 3 γ par ml suivant la partie de la courbe utilisée.

3. *Protocole expérimental :*

On fait passer l'air pollué pendant 24 heures à l'aide d'une pompe (débitant 2 m^3 en 24 heures) dans 100 ml d'eau oxygénée, l'eau oxygénée recueillie est traitée comme nous l'avons indiqué dans l'obtention de la courbe étalon. On ajoute ensuite 100 ml de milieu de Starkey à double concentration. On fera une dilution de la solution de sulfate de sodium obtenue si un premier dosage indique une quantité de SO_2 supérieure à la limite précédemment fixée.

Les flacons ainsi préparés sont stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 30 minutes et ensemencés en même

temps que des témoins avec 8 ml d'une culture de 24 heures de la souche-test dans du milieu de Starkey non sulfaté.

On prend les transmissions initiales au photomètre à la longueur d'onde de 420 mμ et l'on porte sur la courbe la transmission de l'essai, lue lorsque les transmissions données par les témoins se trouvent sur la courbe étalon.

On lit directement en abscisse la teneur en SO_4Na_2 par ml, que l'on ramène en PPM de SO_2 de la façon suivante :

$$\frac{\text{Teneur en } SO_4Na_2 \text{ en } \gamma \text{ par ml} \times 62 \times 200}{142 \times 2.800\ \gamma \times 2} = \text{PPM de } SO_2$$

62 = P.M. du SO_2.

142 = P.M. du SO_4Na_2.

200 = Quantité de milieu ensemencé.

2.800 γ = 1 PPM.

2 = 2 m^3.

CONCLUSION

L'étude de la réduction des sulfates par voie microbienne nous a conduit à utiliser, pour le dosage microbiologique, une espèce bactérienne métabolisant accessoirement les sulfates en sulfites dans des conditions définies par l'expérience.

Cette espèce : *Pseudomonas fluorescens* variété *putida* isolée du sol présente un pouvoir d'utilisation des sulfates, maximum pour des concentrations comprises entre 100 γ et 350 γ par ml. Dans ces limites, nous avons pu réaliser aussi bien un dosage des sulfates, qu'un dosage de SO_2 après oxydation en sulfate de sodium.

Néanmoins, l'apparition d'un pigment diffusible dans le milieu pourrait fausser les lectures photométriques au bout d'un certain temps de culture. Pour remédier à cet inconvénient, ces lectures devront être faites avant l'apparition du pigment (c'est-à-dire au bout de 14 heures, comme nous avons pu le déterminer expérimentalement, en outre à ce stade on obtient en fonction de la concentration en sulfates les réponses de croissance les plus significatives).

Dans le dosage du SO_2, la transformation préliminaire en sulfate de sodium nous a paru relativement aisée, mais l'influence de l'eau oxygénée sur la croissance peut être,

si l'on n'y prend garde, un inconvénient compliquant la méthode et obligeant à répéter les essais.

Pseudomonas fluorescens variété *putida* se prête donc à un dosage bactériologique des sulfates et du SO_2 sous forme de sulfate de sodium. Par contre, *Sporovibrio desulfuricans*, bien que plus spécifique, ne peut être utilisé en pratique, car sa culture en anaérobiose stricte rend la méthode plus longue et difficilement réalisable.

Le Président de Thèse,
L. BOUISSET.

Vu : *Le Doyen,*
pour le Doyen, l'Assesseur,
P. BLANC.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Toulouse, le 14 mai 1963.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

Baars (J.K.) (1930). — Over sulfaatreductie door bacterien. Dissertation, W. D. Meinema, N. V., Delft.

Beijerinck (W.M.) (1895). — Uber Spirillum desulfuricans als Ursache von sulfat-reduktion. *Zbl. Bakt* (2. Abt), 1, 1, 49, 104.

Butlin (K.R.), Mary (E.), Adams and Margaret Thomas. — The isolation and cultivation of sulphate-reducing. The *Journal General Microbiology*, vol. 3. 1949.

Casarès Gil, voir Dumas. — Bactériologie médicale. Editions médicales Flammarion, p. 173.

Van Delden (A.) (1903). — Beitrag zur kenntnis der Sulfat-reduktion durch Bakterien. *Zbl. Bakt.* (2. Abt), 11, 31, 113.

Dostalek (M.) et Spurny (M.). — Cultivation characteristics of sulphate reducting bacteria, folia biol., 1956, t. 2, pp. 338-343.

Frank (L.H.), de Moss (R.D.). — On the biosynthesis of pyocianine. *J. Bact.*, 1959, t. 77, pp. 776-782.

Grossman (J.P.) et Postgate (J.R.) (1953). — Cultivation of sulphate-reducing bacteria. *Nature*, Lond. 171, 600.

KLUYVER (A.J.) et VAN NIEL (C.B.) (1936). — Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zbl. Bakt.* (2. Abt), 94, 369.

HOWARD LEES. — Biochemistry of autotrophic bacteria. edition Butterworths scientific publications. London. 1955.

POCHON (J.) et DE BARJAC (H.). — Traité de microbiologie des sols, édition Dunod, pp. 266, 278-283.

PRÉVOT (A.-R.). — Traité de systématique bactérienne. tome 2, 1961, Dunod, éditeur, pp. 49, 435-437.

SELMAN (A.), WAKSMAN. — Soil microbiology. John Wiley et Sons, inc. New York, p. 231.

STARKEY (R.L.) (1938). — A study of spose formation and other morphological characteristics of Vibrio desulphuricans. *Arch. Mikrobiol.*, 9, 268.

TANNER (F.W.) (1918). — Studies on the bacterial metabolism of sulphur. II. Formation of hydrogen sulphide from certain sulphur compounds by yeast fungi. *J. Amer. Chem. Soc.*, 40, 663.

TANNER (F.W.) (1917). — *J. Bact.*, 1917, 2, 585.

TARR (H.L.A.) (1933). — *Biochem. J.*, 1933, 27, 1869.

WEST (Ph. W.) and GAEKE (G.C.). — Coaste chemical laboratoris Loisiana State University Baton rouge.

WINOGRADSKY (S.). — Microbiologie du sol. problèmes et méthodes, p. 36. Masson et C^ie^, éditeurs, 1949.